Aus der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Freien Universität Berlin im Städt. Rudolf-Virchow-Krankenhaus
Direktor: Professor Dr. med. Hans Wolfgang Spier

VERSUCH EINER TRENNUNG DER WEISSEN UND ROTEN BLUTKÖRPERCHEN, INSBESONDERE BEIM MEERSCHWEINCHEN.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Inge Konietzko
aus Breslau

1966

Aus der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Freien Universität Berlin im Städt. Rudolf-Virchow-Krankenhaus
Direktor: Professor Dr.med. Hans Wolfgang S p i e r

V e r s u c h e i n e r T r e n n u n g d e r w e i ß e n u n d r o t e n B l u t k ö r p e r c h e n, i n s b e s o n d e r e b e i m M e e r s c h w e i n c h e n.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Inge Konietzko
aus Breslau

Dekan: Professor Dr.med. Wilhelm M a ß h o f f

Referent: Professor Dr.med. Hans Wolfgang S p i e r

Korreferent: Professor Dr. med. Heinrich G e r h a r t z

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 18. 7. 1966

INHALTSVERZEICHNIS

A) Einleitung

I) Daten aus der Physiologie des Humanblutes

II) Daten aus der Physiologie des Meerschweinchenblutes

III) Methoden zur Trennung der Leukozyten von den Erythrozyten

1) Sedimentationsmethoden

2) Zentrifugier-Methoden

B) Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

I) Leukozytenanreicherung mit Hilfe der Sedimentationsmethode

a) Humanblut

b) Meerschweinchenblut

II) Leukozytenanreicherung durch Zentrifugieren mit 1%iger Na-Desoxycholat-30%iger-Saccharose-Lösung

III) Leukozytenanreicherung durch Zentrifugieren mit hochprozentiger Eiweißlösung

a) Herstellung hochprozentiger Eiweißlösungen

aa) Dialyse

bb) Ultrafiltration

cc) Ausfällen mit Methanol-Äther bei -20^{o}

b) Leukozytenanreicherung durch Zentrifugieren mit hochprozentiger Eiweißlösung

IV) Leukozytenanreicherung durch Zentrifugieren mit hochprozentiger Glykogen-Lösung

V) Versuch einer Leukozyten-Differenzierung mit Hilfe von Glykogen-Lösungen

a) Bestimmung des spezifischen Gewichtes der Meerschweinchen-Blutzellen

b) Leukozyten-Differenzierung mit Hilfe von Glykogen-Lösungen

C) Diskussion

D) Zusammenfassung

A) Einleitung

Die Isolierung funktionstüchtiger Leukozyten ist für viele biochemische, diagnostische und experimentelle Untersuchungen von besonderem Interesse. BRAUNSTEINER (5) z.B. verwendete Leukozytenanreicherungen u.a. als Hilfsmittel zur Diagnose aleukämischer Leukämien.

In den letzten Jahrzehnten wurden isolierte Leukozyten zur passiven Übertragung der Allergie vom verzögerten Typ benutzt. Dabei ist eine exakte und rationelle Trennung der Leukozyten von den Erythrozyten wünschenswert.

Zur Gewinnung weißer Blutkörperchen sind verschiedene Methoden bekannt. Für Übertragungsstudien am Meerschweinchenmodell benutzten CHASE (6) sowie HAXTHAUSEN (14) Zellanreicherungen von Lymphknoten, SKOG (24,25) Zellen aus Peritonealexsudat sowie von Milz und Thymus. Zur Isolierung der Leukozyten aus dem peripheren Blut beim Menschen werden verschiedene Methoden angegeben (2, 3, 5, 9, 13, 17, 20), von denen einige in Abschnitt A, III zitiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, weitgehend erythrozytenfreie Leukozyten aus dem peripheren Blut, besonders des Meerschweinchens, zu gewinnen.

In den einleitenden Abschnitten werden einige kurze Angaben zur Physiologie der Blutzellen beim Menschen sowie Meerschweinchen gebracht, um Unterschiede in Bezug auf Morphologie und Verhaltensweise dieser Zellen deutlich werden zu lassen. Anschließend wird über eigene Untersuchungen und Ergebnisse berichtet.

I) Daten aus der Physiologie des Humanblutes (1)

Zusammensetzung: Blutplasma . . . . . 50 - 57 %
Geformte Bestandteile . . . . . 43 - 50 %

Spezifisches Gewicht:

Erythrozyten	1.084 - 1.117
Leukozyten	1.068 - 1.075
Thrombozyten	1.045 - 1.053
Serum	1.027 - 1.032
Eiweißfreies Plasmafiltrat . . .	1.007
Dichtezuwachs, durch 1 % Serumeiweiß verursacht	0.00276

Die Werte für die spezifischen Gewichte wurden, da das Aräometer zu ungenau ist (1a), mit dem HAMMERSCHLAG'schen Schwebeverfahren - Beobachtung des Verhaltens eines Blut- bzw. Serumtropfens in einer Chloroform-Benzol-Mischung - ermittelt.

Blutsenkungsgeschwindigkeit

Normalwerte nach WESTERGREEN:

Männer 3 - 7)
Frauen 3 - 10) mm in der 1. Stunde

Nach der 2. Stunde liegt der Wert höher als der doppelte Einstundenwert.

Erythrozyten

Anzahl: Mann . . . . . 5 - 5,55 Mill/mm^3

Frau . . . . . 4 - 4,5 Mill/mm^3

Leukozyten

Nüchternwert beim erwachsenen Menschen . . . . . 5500 - 8000/mm^3

Morphologische Einteilung (HINSBERG†)

Erwachsene, Mittel %

Lymphozyten	25
Monozyten	1
Polymorphkernige Leuko	(74)
a) neutrophile	71
b) acidophile-eosinophile	2,5
c) basophile	0,5

Thrombozyten

Anzahl: 200 000 - 300 000/mm^3, neuerdings (AGGELER† et al., 1946) 400 000.

Plasmaeiweißstoffe

Die Plasmaeiweißstoffe unterteilen sich in:

1. Fibrinogen (4%)
2. Serumeiweiß, davon
   - Serumalbumin 62%
   - Serumglobulin 35%

Serumeiweißstoffe:

Erwachsene . . . . . 6,6 - 8,2 g/100 ml

Alle mit + gekennzeichneten Autoren siehe unter (1)

II) Daten aus der Physiologie des Meerschweinchenblutes (1)

1) Erythrozyten (SCHEMMER+)

Anzahl beim erwachsenen Tier im Durchschnitt

6 Mill/mm^3, nach SCHEPANK (22) 5 Mill/mm^3.

Senkungsgeschwindigkeit der Erythrozyten

Methode	Senkung nach 30 min	1 h	2 h	24 h
Linzenmaier (WIRTH)	0,75 mm	1,5 mm	3 mm	20 mm
Reichel (WIRTH)	0,8 mm	1,7 mm	4,5 mm	23 mm
Westergreen (KLIENEBERGER)		1-2 mm	2,5-4 mm	

2) Leukozyten (SCHEMMER+)

Tageszeit, Fütterung und Geschlecht haben keinen Einfluß auf die Leukozyten.

Autor		Schwankungsbreite	Mittelwert
KLIENEBERGER	(1927)	6900 - 13400	10830
WIRTH	(1950)	8000 - 15000	12000
DUMAS	(1953)	4800 - 10400	8280
SCHEMMER	(1954)	3200 - 15000	9000
SCHEPANK	(1954)	3000 - 18000	8000

Schwankungsbreite bedeutet dabei allgemeine Streubreite der Werte im untersuchten Kollektiv; das Tierindividuum soll keine besondere Streubreite zeigen.

Prozentuale Verteilung der einzelnen Leukozytenarten (SCHEMMER+)

		Neutro	Eos	Baso	Lympho	Mono
SCHILLING,	1911	25-30	1 - 3	1 - 3	65-70	1 - 2
BENDER und DE WITT,	1923	35-60	3 - 4	1	35-55	5 - 8
KLIENEBERGER,	1927	9-47,5	0,5 - 38	0 - 1,25	33-88,6	0 - 4
WIRTH ,	1950	20-45	3 - 20	0,5- 3	38-62	3 - 10
DUMAS,	1953	40-60	1 - 10	1 - 6,5	39-65	3 - 10
SCHEMMER,	1954	18-35	1 - 5	0 - 3	55-75	3 - 12
SCHEPANK, (22)	1954	35			65	

Die neutrophilen Leukozyten werden auch als pseudoeosinophile Leukozyten bezeichnet. Ihr prozentualer Anteil liegt gewöhnlich unter 50, während die Lymphozyten den Hauptanteil bestreiten. Letztere unterteilen sich in große und kleine, wobei die kleinen weitaus überwiegen.

3) Thrombozyten (SCHEMMER+)

Die Anzahl beträgt nach KLIENEBERGER+ im Durchschnitt 115 000, nach SCHEMMER+ 120 000 - 132 000.

4) Serumeiweißstoffe (HINSBERG+)

5,4 g/100 cm^3

III) Methoden zur Trennung der Leukozyten von den Erythrozyten

Zur Leukozytenseparierung des Humanblutes werden im Schrifttum verschiedene Methoden angegeben, wobei es sich im wesentlichen um die Sedimentation ungerinnbar gemachten Blutes sowie das Zentrifugieren mit dem Ziel der buffy-coat-Gewinnung handelt.

1) Sedimentationsmethoden

a) LAWRENCE (1952) gewinnt Leukozyten, indem er heparinisiertem venösen Humanblut Fibrinogen hinzufügt, wodurch die Erythrocyten beschleunigt sedimentieren und die Leukozyten im überstehenden Plasma zu finden sind.

Der Autor benutzt im wesentlichen folgende Methode:

120 ml venöses Humanblut, mit heparinisierten Spritzen entnommen, werden in Reagenzgläser gegeben, die 0,1 mg Heparin pro ml Blut enthalten. Hinzugefügt wird 0,1 ml (ca. 4 mg) Rinderfibrinogen pro ml Blut. Das heparinisierte und mit Fibrinogen versetzte Blut wird in Portionen zu je 10 ml in konische Zentrifugiergläser abgefüllt, die für 30 - 45 min in einem Wasserbad von 37°C verbleiben. Das Leukozyten enthaltende überstehende Plasma wird zu je 10 ml in Zentrifugiergläser, deren Boden aus einem graduierten Kapillarröhrchen besteht, abpipettiert und 1000 rpm/15-20 min zentrifugiert. Das überstehende zellfreie Plasma wird verworfen. Die gepackten Leukozyten (ca. 0,025 ml von je 10 ml "Aufschwemmung") werden in 2 ml frisch bereitetem heparinisierten Plasma aufgeschüttelt. Die so gewonnenen Zellsuspensionen werden noch zweimal, wie oben beschrieben, gewaschen. Das Durchschnittsergebnis von 120 ml Blut beträgt 0,2 - 0,3 ml gepackte Leukozyten.

Zu den Faktoren, die sowohl die Leukozytenanreicherung als auch die Erythrozytenverunreinigung beeinflussen, gehören einmal die dem heparinisierten Blut hinzugefügte Fibrinogenmenge, zum anderen die Erythrozyten-Sedimentationszeit.

Mikroskopische Kontrollen ergeben eine weitgehend intakte Morphologie der angereicherten Leukozyten. Die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Injektion der Leukozytenanreicherung überschreitet nicht 6 Stunden.

b) **BRAUNSTEINER** et al. (1952) separieren Leukozyten auf folgende Weise:

2 ml Periston BAYER (3,5%iges Kollidon) sowie 5 ml heparinisiertes Blut werden in eine schlanke Eprouvette pipettiert und für ca. 3 Stunden in den Brutschrank gestellt (37°C). Das hier verwendete Blutersatzmittel Periston hat gegenüber Fibrinogen den Vorteil, daß es sterilisierbar ist.

Der sich bildende Überstand wird schichtweise abgesaugt, wobei sich in den oberen Lagen eine reine Thrombozytenanreicherung, in den unteren eine Leukozytenansammlung findet.

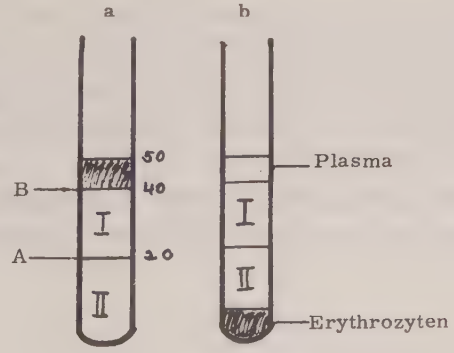
Als Ergebnis erhalten die Autoren bei normaler Zellzahl des verarbeiteten Blutes bis zu 20 Leukozyten und bis zu 100 Thrombozyten im Blickfeld bei 1000facher Vergrößerung. Die Zellen zeigen intakte Morphologie und Funktion (amöboide Beweglichkeit, Phagozytosefähigkeit).

Als Anreicherungsverfahren bei vorwiegend leukopenischem Blut wird diese Methode zur Differenzierung der Leukozyten (z.B. bei aleukämischen Leukämien) mit zufriedenstellenden Resultaten angewendet.

2) Zentrifugationsmethoden

a) AGRANOFF et al. (1951) geben eine Trennung von polymorphkernigen Leukozyten, Lymphozyten und Erythrozyten durch Zentrifugieren unter Benutzung ihres unterschiedlichen spezifischen Gewichtes an. Die Autoren bereiten zwei isosmotische Rinderalbuminlösungen, Albumin I mit dem spezifischen Gewicht 1.065 - 1.085 und Albumin II mit 1.094. In ein WINTROBE-Glas (I.D. 3,0 mm) wird bis zur Marke 20 Albumin II, darauf bis zur Marke 40 Albumin I geschichtet, weiterhin bis Marke 50 eine Kalium-Ammonium-Oxalat-Blutmischung pipettiert. Die Grenzen zwischen den Albuminlösungen und Blut (A und B, s.Skizze) sind scharf.

a = vor zentrifugieren
b = nach zentrifugieren



Zentrifugieren erfolgt erst mit 500 rpm/10 min, dann mit 3000 rpm/20 min, wobei die Basis des WINTROBE-Glases 17,1 cm vom Rotationszentrum entfernt ist. Nach dem Zentrifugieren finden sich im Grenzbereich Plasma-Albumin I (s.Skizze) 90 - 96 % Lymphozyten, an der Grenze Albumin I - Albumin II (B, s.Skizze) 93 - 95 % polymorphkernige Leukozyten. Die Erythrozyten liegen am Boden des Glases.

Beide Trennschichten A und B, d.h. die Leukozytenanreicherungen, weisen Erythrozyten auf.

Der innere Durchmesser des Zentrifugierglases, die Höhe der Albumin- und Blutschicht sowie der Abstand der Basis des Zentrifugierglases vom Rotationszentrum beeinflussen die Leukozytenausbeute wesentlich.

b) EPSTEIN und KLIGMAN (1957) verwenden folgende Methode zur Leukozytenseparierung bei Humanblut: 150 - 300 ml Blut werden mittels Venenpunktion entnommen. Zu je 50 ml Blut werden 2 - 3 ml einer 1%igen SEQUESTREN-Lösung sowie 5 ml 3,5%iges Polyvinylpyrrolidon gegeben. Das Gemisch wird zentrifugiert (900 rpm/10-15 min). Der Überstand (Plasma) und die oberste Erythrozytenschicht, die fast alle Leukozyten enthält, werden von den Zentrifugiergläsern abpipettiert und zweimal mit SEQUESTREN gewaschen (1000 rpm/ 15-20 min). Von dem letzten Zentrifugat wird der buffy coat vorsichtig abgenommen und noch einmal mit 1%igem SEQUESTREN gewaschen (1000 rpm/15 min).

Die Autoren geben dabei eine Leukozytenausbeute von 100 - 600 x 10^6 aus 150 - 300 ml Blut an.

Zur Leukozytenseparierung aus Meerschweinchenblut verwenden DE WECK und BRUN (1956) eine von LAWRENCE (17) für Humanblut entwickelte Methode:

Durch Herzpunktion gewonnenes und heparinisiertes Meerschweinchenblut wird mit der 1,5-fachen Menge einer 3,5%igen Polyvinylpyrrolidon-Lösung (SUBTOSAN SPECIA) versetzt und in Zentrifugiergläsern bei 37° für 60 min in den Brutschrank gestellt. Die Erythrozyten sedimentieren; das überstehende Plasma, das die Leukozyten enthält, wird abpipettiert und vorsichtig zentrifugiert. Der Rückstand des Zentrifugates wird mit Plasma aufgeschüttelt und zur Injektion verwendet.

Mit oben erwähnter Methode werden 50 - 80% der im entnommenen Blut enthaltenen Leukozyten gewonnen. Die Erythrozytenverunreinigung beträgt 2 - 4 %.

B) Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

Nachfolgende Versuche haben das Ziel, erythrozytenfreie Leukozytenanreicherungen, insbesondere von Meerschweinchenblut, zu gewinnen.

I. Leukozytenanreicherung mit Hilfe der Sedimentationsmethode

Es wurden 25 Vorversuche mit Humanblut durchgeführt und die hierbei erarbeitete Methode anschließend auf das Meerschweinchenblut übertragen.

a) Humanblut

20 - 40 ml Blut wurden mittels Venenpunktion entnommen, 1000 : 1 mit Liquemin ROCHE versetzt und in einem Erlenmeyerkolben vorsichtig geschüttelt (alle verwendeten Glasgeräte sind silikonisiert). Anschließend erfolgte eine quantitative und qualitative Leukozytenbestimmung. Das heparinisierte Blut wurde im Verhältnis a) 1 : 1, b) 5 : 2 mit Periston ROCHE (3,5%iges Polyvinylpyrrolidon) versetzt und das Gemisch zu je 8 ml in Zentrifugiergläser gefüllt, die mit einem Neigungswinkel von 60 - 70° dann in ein Wasserbad gestellt wurden. Absaugen des Überstandes so scharf wie möglich, jedoch ohne Erythrozyten zu aspirieren, im Bereich der ermittelten optimalen Abnahmezeiten von 70 - 80 min.

Außer den Zentrifugiergläsern wurden Buretten als Sedimentiergefäße benutzt, deren Neigungswinkel sich langsam von 0– – → 60° änderte. Hier lagen die optimalen Abnahmezeiten zwischen 30 - 45 min.

Der abgesaugte Überstand wurde zentrifugiert (240 g), mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen (240 g) und das aus angereicherten Leukozyten bestehende Sediment anschließend in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung aufgeschüttelt. Es folgte eine quantitative und qualitative Leukozytenkontrolle (s. Tabelle 1).

Ergebnisse: (s. Tabelle 1)

Von insgesamt 25 Versuchen wurden 17 mit Zentrifugiergläsern als Sedimentiergefäße durchgeführt. Die Ausbeute betrug im Durchschnitt 70 % der im verarbeiteten Blut enthaltenen Leukozyten.

Für weitere 8 Versuchsreihen kam eine Burette zur Anwendung, wobei eine Leukozytenausbeute von durchschnittlich 73% der im Ausgangsblut enthaltenen Leukozyten erzielt werden konnte.

Bei den ersten 17 Versuchen wirkte sich der Peristonzusatz wie folgt aus:

a) Blut/Periston = 1/1 (10 Versuche)

Erzielt wurde eine Anreicherung von durchschnittlich 75 % der im verarbeiteten Blut enthaltenen Leukozyten.

b) Blut/Periston = 5/2 (7 Versuche)

Es ergab sich eine Anreicherung von durchschnittlich 64 % der im Ausgangsblut enthaltenen Leukozyten.

Bei Verwendung von 20 ml Blut konnte durchschnittlich eine Leukozytenanreicherung von 110 x $10^6/cm^3$ erzielt werden (s. Tabelle 1).

Es soll hervorgehoben werden, daß der Gebrauch von Buretten gegenüber Zentrifugiergläsern als Sedimentiergefäße rationeller erscheint. Bei einmaliger Verarbeitung des Blutes unter Benutzung von Buretten erhält man die gleichen Anreicherungsergebnisse wie bei zweimaliger Verarbeitung des Blutes unter Gebrauch von Zentrifugiergläsern. Außerdem verkürzt sich der Arbeitsgang bei Burettengebrauch um fast 50 % (45 min gegenüber 80 min bei Zentrifugiergläsern).

In quantitativer Hinsicht kann eine Ausbeute von durchschnittlich 110 x 10^6 Leukozyten aus 20 ml Blut als zufriedenstellendes Ergebnis bezeichnet werden. Allerdings läßt sich auch bei vorsichtigstem Arbeiten eine völlige Erythrozytenfreiheit der Leukozytenanreicherung praktisch nicht erzielen, da für die Gewinnung einer nicht zu kleinen Leukozytenmenge die Abnahme des erythrozytensedimentnahen Überstandes Vorbedingung ist.

Tabelle 1: (Sedimentationsmethode/Humanblut)

Versuch Nr.	Normalblut 10^6 / ml	Anreicherung 10^6 / ml	% v. Gesamt	Bemerkung
1	440/40	200/1	50	Sedimentationsgefäß: Zglas
2	200/20	150/1	75	Blut/Periston = 1/1
3	106/20	80/1	80	"
4	200/20	100/1	50	"
5	100/20	100/1	100	"
6	160/20	110/1	70	"
7	200/20	190/1	95	"
8	100/20	80/1	75	"
9	80/20	60/1	75	"
10	160/20	70/1	44	Blut/Periston = 5/2
11	180/30	100/1	55	"
12	200/40	110/1	55	"
13	180/20	145/1	80	"
14	160/20	150/1	94	"
15	180/20	110/1	60	"
16	130/20	75/1	57	"
17	350/70	150/1	43	Sedimentationsgefäß: Burette
18	350/70	150/1	43	Blut/Periston = 5/2
19	150/30	140/1	93	"
20	150/30	100/1	65	"
21	150/30	100/1	65	"
22	210/30	180/1	85	"
23	80/20	60/1	80	"
24	15/5	12/1	80	"
25	250/50	225/1	90	"

b) Meerschweinchenblut

Mittels Herzpunktion wurden 4 - 5ml Meerschweinchenblut (Ms-Blut) entnommen, 50 : 1 mit Heparin (Liquemin ROCHE) versetzt, in einem Zentrifugenglas geschüttelt und anschließend eine quantitative und qualitative Leukozytenbestimmung durchgeführt. Das heparinisierte Ms-Blut wurde a) mit Periston ROCHE im Verhältnis 1/1 oder 5/2, b) mit Periston-Rinderfibrinogen versetzt. Ca. 30 mg Rinderfibrinogen wurden in 2ml Periston gelöst, in ein Wasserbad von 37°C gestellt und anschließend dem heparinisierten Ms-Blut im Verhältnis 1 : 1 sowie 5 : 2 zugegeben. Weiterhin wurde das heparinisierte Ms-Blut c) mit Periston und physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis 5 : 5 : 2 versetzt.
Die Sedimentation erfolgte a) in Haematokritröhrchen, b) in kleinen Buretten, wobei sich die Gefäße in einem Wasserbad von 37°C befanden.
Während die Haematokritröhrchen einen Neigungswinkel von 60 - 70° erhielten, wurde die Burettenlage in den ersten 5 min der Sedimentation von 0° (Horizontale) bis 60° verändert. Durch fraktioniertes Absaugen im Bereich von 20 - 110 min (Abstand 10 min) wurde versucht, die zweckmäßigsten Abnahmezeiten zu ermitteln. Es ergab sich ein "Optimum" bei etwa 70 min. Der vorsichtig, aber scharf abgesaugte Überstand wurde zentrifugiert (240 g) und dasSediment (1) mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen (240 g). Sediment (2) wurde in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung aufgeschüttelt und eine quantitative sowie qualitative Leukozytenbestimmung durchgeführt.

Oben erwähnte Methode (s. Tabelle 2) zeigte im Gegensatz zu DE WECK und BRUN (1956) (26) unzureichende bzw. fehlende Leukozytenanreicherung, offenbar durch sehr langsame Erythrozytensedimentierung bedingt.

Eine Übertragung der weiter oben beschriebenen - zur Leukozytenseparierung des Humanblutes durchaus geeigneten - Sedimentationsmethode auf das Meerschweinchenblut ist somit offenbar nicht möglich.

Tabelle 2: Sedimentationsmethode (Ms-Blut)

Versuch-Nr.	Normalblut 10^6/ml	Anreicherung	Bemerkung
1	54/3	keine	Hämatokritröhrchen (Sed. gefäß) Blut/Periston = 1/1 Nach 90 min bildet ca. 0,5 cm Überstand !!
2	40/4	10 x 10^6/2 ml a) 4 x 10^6/ml b) 6 x 10^6/ml	Blut/Periston = 1/1 Fibrinogen a) n. 75 min ab b) n. 90 min ab
3	24/3	16,5 x 10^6/1 ml	Blut/Periston-Fibrinogen = 5/2 - Günstigste Abnahmezeit getestet n. 70' .....38800/0,25ml n. 85' .....21500/ " n. 100'..... 5500/ " n. 115'..... 6600/ "
4	27/3	20,5 x 10^6/1 ml	wie 3) n. 50' ..... 23100/0,25ml n. 60' ..... 23600/ " n. 70' ..... 24500/ " n. 80' ..... 14400/ "
5	24/3	24 000/1 ml	Burette Blut/Periston = 5/2
6	32/4	5 x 10^6/1 ml	"
7	40/4	1 x 10^6/1 ml	"
8	32/4	keine	Blut/Periston = 1/1
9	40/5	600 000/1 ml	"
10	45/5	600 000/1 ml	Hep. Blut/NaCl = 5/2 Hep. Blut-NaCl/Periston = 1/1
11	48/6	1,5 x 10^6/1 ml	"
12	36/4	keine	"

II) Leukozytenanreicherung durch Zentrifugieren mit 1%iger Na-Desoxycholat-30%iger Saccharose-Lösung

Methodik: (Humanblut)

Herstellung der Na-Desoxycholat-Saccharose-Lösung:

0,1 g Na-desoxycholat
3,5 ml Saccharose-Lösung 30%ig
ad 100,0 ml physiolog. NaCl-Lösung

8 ml Venenblut wurden 100 : 1 mit Liquemin ROCHE sowie 1 : 4 mit physiologischer NaCl-Lösung versetzt. Zentrifugieren (100 g).

In eine Tuberkulinspritze, in der sich 0,3 ml einer 1%igen Na-Desoxycholat-30%igen Saccharose-Lösung befanden, wurden 0,3 ml Erythrozyten- (Plasma-Periston) vom Boden des Originalglases (1) eingesaugt und zentrifugiert (1500 g). Der klare, durch Desoxycholat-Hämolyse tiefrote Überstand des Zentrifugates wurde in die Tuberkulinspritze (ca. 0,45 ml) zurückgesaugt und vorsichtig in den Boden des Originalglases (1) zurückgegeben. Zentrifugieren (400 g). Das Speckhäutchen schwamm nicht, wie erwartet, an der Desoxycholat-Saccharose/Plasma-Grenze.

Eine Abtrennung des buffy coat mit Hilfe 1%iger Na-Desoxycholat-30%iger Saccharose-Lösung konnte mit den gewählten Versuchsbedingungen nicht erzielt werden.

III) Leukozytenanreicherung durch Zentrifugieren mit hochprozentiger Eiweißlösung

a) Herstellung von hochprozentigen Eiweißlösungen

Es wurde zunächst Eiweißtrockensubstanz aus Humansammelserum hergestellt, um daraus mit Hilfe eines geeigneten Lösungsmittels (z.B. Ringer-Laktat-Lösung) die erforderliche hochprozentige Lösung herstellen zu können. Naturgemäß wären auch im Handel befindliche Plasma-Eiweiße verwendbar gewesen, doch ist dieser an sich naheliegende Weg mit erheblichen Kosten verbunden.

Das Serumeiweiß wurde auf verschiedene Weise gewonnen:

aa) Dialyse, Exsikkator
bb) Ultrafiltration
cc) Ausfällen mit Methanol-Äther bei -20°C

aa) Dialyse

0,5%ig mit Nipagin versetztes menschliches Sammelserum wurde ca 12 Stunden gegen H_2O dialysiert und das Dialysat anschließend in einem mit konzentrierter Schwefelsäure beschickten Exsikkator entwässert. Der staubtrockene Rückstand wurde im Mörser pulverisiert und mit Ringer-Laktat-Lösung zur Herstellung der erforderlichen 40%igen Eiweißlösung verwendet.

Als entscheidend nachteilig erwiesen sich der "unerträglich" langsame Lösungsvorgang, die ungenügende Löslichkeit der gewonnenen Eiweißtrockensubstanz schlechthin sowie die sich fast durchwegs einstellende starke bakterielle Verunreinigung, die sich durch Trübung, Fällung, Farbänderung und Geruch bemerkbar machte und mikroskopisch eindeutig nachweisbar war.

bb) Ultrafiltration

0,5%ig mit Nipagin versetztes Humansammelserum wurde nach Vorfiltrierung mit ca. 16 - 18 atü durch das eiweißdichte Filter 60 gepreßt. Das verwendete Membrandruckfiltrationsgerät (Membranfilter-Ges. mbH., Göttingen) wurde dabei einer Schüttelrotation zur besseren Verteilung des Rückstandes ausgesetzt. Anschließend wurde der zähklebrige Filterrückstand zur Dehydrierung in einen mit konzentrierter Schwefelsäure beschickten Exsikkator gegeben. Aus der pulverisierten Trockensubstanz konnte mit Ringer-Laktat die gewünschte 41%ige Lösung hergestellt werden.

Auch hier erwies sich, wie bei dem nach aa) gewonnenen Eiweiß, die Löslichkeit der erhaltenen Eiweißtrockensubstanz für die weiteren Verwendungszwecke als unzureichend. Die bakterielle Verunreinigung war auch hier nicht

zu umgehen. Als recht unrationell muß die lange Filtrationsdauer (ca. 15 Stunden für 50 ml Sammelserum) betrachtet werden.

cc) Ausfällen mit Methanol-Äther bei -20°C (8)

Zur Verwendung gelangten folgende Lösungen:

1) METHANOL p.a., 90%ig) zu gleichen Teilen,
   AETHER p.n.) 0,5%o-ig mit Nipagin versetzt (Lsg I)
2) METHANOL p.a. 100%ig) (Lsg II)
3) AETHER p.n. 0,5%o-ig mit Nipagin versetzt (Lsg III)

Lösung I - III einschließlich der verwendeten Geräte wurden für wenigstens 24 Stunden in die Tiefkühltruhe (-20°C) gestellt.

Methodik:

100 ml vorfiltriertes Humansammelserum (Membrandruckfiltrationsgerät, G 1) wurden in dünnem Strahl unter laufendem Schütteln in das tiefgekühlte (-20°C) Mischgefäß gegeben, in dem sich 500 ml der ebenfalls tiefgekühlten Lösung I befanden. Anschließend kam das Mischgefäß sofort wieder für mindestens 12 Stunden in die Tiefkühltruhe. Diese tiefgekühlte Mischung (Serum + Lösung I) wurde nun zwecks Erleichterung der späteren Verarbeitung in großen, auf -20°C gekühlten Zentrifugiergläsern zentrifugiert (2000 g). Es folgte vorsichtiges Abgießen der überstehenden "Milch".
Der Bodensatz wurde mit ca 3-fachem Volumen Methanol-Äther-Mischung (Lsg I) gut aufgequirlt und sofort auf eine eiskalte, auf ein Sauggefäß aufgesetzte Rundfilternutsche gegeben. Das Sauggefäß stand in einem mit CO_2-Trockeneis teilgefüllten Plastikeimer. Sobald die Hälfte der Mischung mittels Wasserstrahlpumpe durch das Filter gesaugt worden war, wurden ca 2 x 100 ml Methanol 100%ig (Lsg II), sowie anschließend ca 300 ml Äther p.n. (Lsg III) in kleinen Portionen hinzugefügt.

Als Filterrückstand erhält man eine fast trockene, weiße, bröcklige Masse, nach weiterem Feuchtigkeitsentzug gut zerreibbare weißliche Schuppen.

Als sehr vorteilhaft erwies sich bei dieser Methode der geringe Zeitaufwand, mit dem Eiweißtrockensubstanz bei einfacher Arbeitsmethodik in guter Qualität gewonnen werden konnte. Im Gegensatz zu der nach aa) und bb) hergestellten Trockensubstanz zeigte dieses Eiweiß recht befriedigende Löslichkeit in Ringer-Laktat sowie nur geringfügige bakterielle Verunreinigung.

b) Leukozytenanreicherung durch Zentrifugieren mit hochprozentiger Eiweißlösung

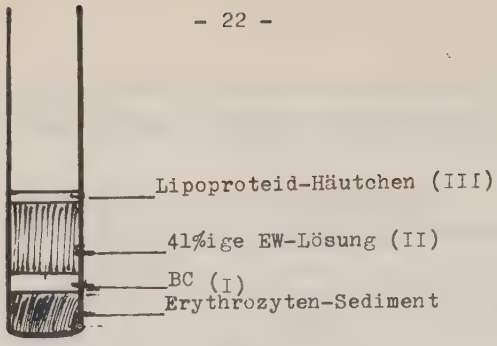
Über die Beziehung zwischen Konzentration und spezifischem Gewicht bei Eiweißlösungen orientiert Tabelle 3.

Tabelle 3: EW-Lsg Konzentration (%) Spez. Gew.

1	1.00276
10	1.0276
20	1.0552
30	1.0828
40	1.1104
41	1.1131
50	1.1380

Methodik:

30 - 50 ml Humanblut werden 100 : 1 mit Liquemin ROCHE sowie 2 : 1 mit Ringer-Laktat versetzt und zu je ca 8 ml in Zentrifugengläser verteilt. Anschließend wird zentrifugiert, beginnend mit 240 g, dann mit 1500 g. Der Überstand (Laktat-Plasma) wird so scharf wie möglich, jedoch ohne den buffy coat zu verletzen, abgesaugt. Buffy coat (BC) 1 wird mit einer Pipette vorsichtig entnommen und zentrifugiert (240 g). Buffy coat 2 wird entnommen und mit steigenden Mengen (1,75 - 3fache der BC-Menge) einer 41%igen Eiweißlösung versetzt sowie anschließend zentrifugiert (1500 g). Die Schichtbildung des Zentrifugates zeigt nebenstehende Skizze:



Von den Schichten I-III werden Ausstriche(Färbung nach PAPPENHEIM) angefertigt.

Ergebnis:

In 15 Versuchen mit Humanblut sowie 5 mit Meerschweinchenblut konnte eine Trennung des buffy coat von dem Erythrozytensediment nicht erzielt werden, was vermutlich auf die hohe Viscosität der 41%-igen Eiweißlösung zurückzuführen ist, die eine Durchwanderung des buffy coat unmöglich machte.

Die Deutung der unbefriedigenden Ergebnisse als Folge einer Zellschädigung durch die unphysiologisch hochkonzentrierte Eiweißlösung ist nicht gegeben, da der osmotische Druck letzterer gering ist; im Gegenteil, eine reine, salzfreie Eiweißlösung ist immer "hypoton".

IV) Leukozytenanreicherung durch Z e n t r i f u g i e r e n mit hochprozentiger Glykogen-Lösung

Glykogen, Molekulargewicht ca $1 \pm 23 \times 10^6$ (RAUEN), löst sich in wäßrigen Medien bis ca 25% bei Zimmertemperatur. Über die Beziehung zwischen Konzentration und spezifischem Gewicht orientiert Tabelle 4 (nach eigenen Bestimmungen).

Tabelle 4:	Glykogen Konz.%	Spez. Gewicht
	10	1.038 (6)
	14	1.056
	15	1.058
	20	1.077 (3)
	22,5	1.087
	25	1.096 (6)

Wie Tabelle 4 zu entnehmen ist, müßte eine 22-23%ige Lösung genügen, um den buffy coat von den Erythrozyten zu trennen.

Methodik zur Leukozyten-Separierung durch Zentrifugieren mit hochprozentiger Glykogen-Lösung

Humanblut bzw. Ms-Blut wird 100 : 1 bzw. 50 : 1 mit Liquemin ROCHE versetzt. Es folgt eine quantitative Leukozytenbestimmung. Das heparinisierte Blut wird mit der doppelten Menge Ringer-Laktat versetzt und zu je maximal 3 ml in Zentrifugiergläser abgefüllt, sowie anschließend zuerst mit 1500 U/min (ca. 300 g), dann mit 4000 U/min (ca. 2000 g) zentrifugiert. Der Überstand (Laktat-Plasma) wird scharf, jedoch ohne den buffy coat zu verletzen, abgesaugt. In das schräggehaltene Zentrifugierglas werden vorsichtig 0,5 ml einer 22,5%igen Glykogen-Lösung (spez. Gewicht 1.087) pipettiert. Gelegentlich schwimmt der buffy coat schon jetzt auf der Glykogenschicht. Anschließend wird die Mischung für 15 min bei 1500 - 2500 U/min (ca. 300 bzw. 800 g) zentrifugiert. Der buffy coat findet sich jetzt an der Plasma-Glykogen-Grenze, wird vorsichtig abpipettiert und mit Ringer-Laktat in einem graduierten Zentrifugierglas gewaschen (1500 U/3 min bzw. ca 300 g). Der gewaschene buffy coat wird in 1 ml Ringer-Laktat aufgeschwemmt und eine quantitative und qualitative Leukozytenbestimmung durchgeführt. (S. Tabelle 8).

Ergebnisse:

In 8 Vorversuchen mit Humanblut enthält der buffy coat im Durchschnitt 50% der im verwendeten Blut enthaltenen Leukozyten, von den 80% auf Lymphozyten entfallen.

In 16 Versuchen mit Meerschweinchenblut ergibt sich eine Anreicherung von im Durchschnitt 60% der im verarbeiteten Blut enthaltenen Leukozyten, davon durchschnittlich 50% Lymphozyten. (S. Tabelle 7)

Zur Frage der Morphologie der buffy-coat-Zellen zeigen routinemäßig angefertigte Ausstriche (Färbung MAY-GRÜNWALD) eine mäßige Schädigung der Granulozyten bzw. Pseudoeosinophilen, während die Lymphozyten intakt erscheinen. Funktionsprüfungen, z.B. auf amöboide Beweglichkeit und Phagozytose, wurden nicht durchgeführt.

Das Zentrifugieren von heparinisiertem Human- bzw. Meerschweinchenblut mit einer 22,5%igen Glykogen-Lösung stellt eine schnelle, ca 1 Stunde dauernde, einfache Methode zur erythrozytenfreien Leukozytengewinnung dar.

Tabelle 5: Leuko-Diff. (Gly/Humanblut)

Versuch Nr.	BC Ly/Gran % %	1.081 Ly/Gr oben%	Ly/Gr Sed.%	1.075 Ly/Gr oben%	Ly/Gr Sed.%	1.070 Ly/Gr oben%	Ly/Gr Sed. %	1.056 Ly/Gr oben%	Ly/Gr Sed.%
1	86/14	80/20	70/30	∅	75/25	100/0	98/2	∅	96/4
2	85/15	o	70/30	o	70/30	o	100/0	96/4	50/50
3	85/15	o	85/15	o	80/20	o	98/2	o	90/10
4	75/25	∅	90/10	o	95/5	∅	95/5	∅	90/10
5	75/25	o	80/20	o	66/33	o	90/10	∅	90/10
6	66/33	o	90/10	o	98/2	o	80/20	∅	95/5

In den mit o bezeichneten Ausstrichen fanden sich insgesamt nur ca. 50 - 100 Zellen maximal.

Tabelle 6: Versuch einer Leuko-Diff. (Gly-Ms-Blut)

Versuch Nr.	BC Ly/Gran % %	1.081 Ly/Gr. oben %	1.081 Ly/Gr. Sed.%	1.075 Ly/Gr. oben %	Ly/Gr. Sed. %	1.070 Ly/Gr. oben %	Ly/Gr. Sed. %	1.056 Ly/Gr. oben %	Ly/Gr. Sed. %
1	66/33	o	80/20	99/1	80/20	o	80/20	ø	50/50
2	33/66	95/5	80/20	o	80/20	ø	80/20	ø	66/33
3	33/66	90/10	50/50	66/33	47/53	ø	80/20	o	70/30
4	33/66	100/0	55/50	98/2	80/20	75/25	50/50	ø	50/50
5	40/60	90/10	96/4	98/2	90/10	ø	90/10	ø	90/10
6	36/64	o	75/25	ø	60/40	ø	70/30	ø	33/66
7	70/30	ø	80/20	o	95/5	ø	88/12	ø	85/15
8	20/80	o	28/72	ø	30/70	ø	20/80	ø	25/75
9	90/10	ø	94/6	o	90/10	ø	90/10	ø	90/10
10	80/20	95/5	75/25	o	75/25	o	80/20	ø	80/20
11	84/16	o	95/5	o	90/10	ø	ø	ø	75/25
12	33/66	ø	84/16	o	90/10	ø	85/15	ø	ø
13	90/10	100/0	60/30	100/0	85/15	ø	88/12	ø	90/10
14	90/10	o	100/0	o	70/30	ø	80/20	ø	80/20
15	25/75	o	25/75	o	25/75	ø	30/60	ø	30/60

In den mit o bezeichneten Fällen fanden sich im Ausstrich insgesamt nur 50 - 100 Zellen, davon 90% Lymphozyten.

Tabelle : 7 (Glykogen/Ms)

Versuch Nr.	Normalblut 10^6/ml	BC 10^6/ml	% v. Gesamt	DD-Blutbild Lympho %
1	35/3	24/ 0,5	60	50
2	18/4	10/ 0,5	55	85
3	15/3	12/ 0,5	80	30
4	40/5	30/ 0,5	75	90
5	21/3	12/ 0,5	57	90
6	20/4	15/ 0,5	75	25
7	20/5	6/ 0,5	30	36
8	70/6	50/ 0,5	71	70
9	45/4,5	10/ 0,5	22	20
10	45/4	18/ 0,5	40	90
11	40/3	34/ 0,5	85	80
12	24/3	9/ 0,5	38	66
13	24/3	10/ 0,5	42	33
14	42/3	32/ 0,5	76	33
15	46/3	27/ 1,0	59	33
16	65/3	54/ 1,0	83	40

Tabelle 8: (Glykogen/Mensch)

1	24/6	12/ 0,5	50	90
2	36/9	16/ 0,5	44	50
3	15/3	9/ 0,5	60	86
4	21/3	7/ 0,5	33	85
5	12/3	6/ 0,5	50	85
6	18/3	7/ 0,5	39	75
7	15/3	8/ 0,5	53	75
8	18/3	13/1, 0	72	66

V) Versuch einer Leukozyten-Differenzierung mit Hilfe von Glykogen-Lösungen

a) Bestimmung des spezifischen Gewichtes der Meerschweinchen-Blutzellen

Ausgehend von dem bekannten spezifischen Gewicht der menschlichen Blutzellen

Thrombozyten . . . . . 1.045 - 1.053
Leukozyten . . . . . 1.068 - 1.075
Erythrozyten . . . . . 1.084 - 1.117

werden Ester-Lösungen in entsprechenden Bereichen hergestellt, um die Werte beim Meerschweinchen auszutesten.

Tabelle 9:

Ester-Lösung	Spez. Gew.
I (Di-n-butyl-phthalat)	1.045
II (Lsg I + III z. gl. Teilen)	1.065
III (lsg. I + IV z. gl. Teilen)	1.084
IV (Diaethyl-phthalat)	1.123

Methodik:

Heparinisiertes Meerschweinchenblut (1 : 50 Liquemin ROCHE) wird 2 : 5 mit physiologischer NaCl-Lösung versetzt und in 4 Portionen geteilt. Jede der vier Teile wird mit der doppelten Menge einer Ester-Lösung I - IV versetzt und zuerst mit 1200 U/5 min, dann mit 3500 U/25 min zentrifugiert.

Ergebnis:

Es finden sich bei I und IV keine Schichtbildung an der Ester-Serum-Grenze, während sich bei II und III ein netzförmig verzweigter buffy coat zeigt, der bei III makroskopisch ca doppelt so hoch erscheint als bei II.

Die qualitative Leukozytenauswertung der entsprechenden buffy coats ergibt für Lösung III 8o% Lymphozyten und 2o% Granulozyten, für II 9o% Lymphozyten und 1o% Granulozyten. Folglich ergibt sich für die Erythrozyten ein spezifisches Gewicht > 1.123; die Bereiche der spezifischen Gewichte der Granulozyten und Lymphozyten überlappen sich offenbar, zumindest bei Anwendung dieser Methode.

b) Versuch einer Leukozyten-Differenzierung mit Hilfe von Glykogen-Lösungen

Hergestellt werden Glykogen-Lösungen mit dem spezifischen Gewicht

a) 1.o56 . . . . . 14 %
b) 1.o7o . . . . . 18 %
c) 1.o75 . . . . . 19 %
d) 1.o81 . . . . . 21 %

Von vorliegender buffy-coat-Aufschwemmung werden 2 Tropfen (ca.o,o4 ml) in je 2 ml von a) - d) pipettiert und 25oo U/1o min (ca 8oo g) zentrifugiert. Vom Überstand und Sediment jedes Zentrifugates wird ein Differentialblutbildausstrich angefertigt und die oberste Schicht auf Thrombozyten kontrolliert (verlängerte PAPPENHEIM-Färbung).

Ergebnisse:

In 6 Versuchen mit Humanblut fand sich bei 3 eine Lymphozytenanreicherung wie folgt (s.Tabelle 5):

Glykogen-Lösung 1.o81 . . . . . 8o% Lymphozyten
Glykogen-Lösung 1.o7o . . . . .1oo% Lymphozyten
Glykogen-Lösung 1.o56 . . . . . 96% Lymphozyten

Eine Verteilung, die nicht wesentlich von der der weissen Blutzellen im jeweiligen Bodensatz abweicht. Mithin kann von einer Differenzierung durch Zentrifugierung nicht gesprochen werden.

In 15 Versuchsreihen mit Meerschweinchenblut fand sich im Überstand von 13 Zentrifugaten eine Anreicherung von Lymphozyten, besonders kleiner Lymphozyten (s.Tabelle 6):

Glykogen-Lsg.	1.o81	1.o75	1.o7o
Lymphozyten %	1oo	1oo	75
	95	1oo	
	95	99	
	9o	66	
	1oo	98	
	98	9o	

Eine zufriedenstellende Differenzierung des buffy coat in Lymphozyten und Granulozyten, besonders mit dem Ziel der Lymphozytenanreicherung, wurde mit dieser Methode bei Meerschweinchen-buffy-coat jedoch auch nicht erreicht.

C) Diskussion

Zu B/I)

Bei Anwendung der Sedimentationsmethode zur Leukozytenseparierung bei Humanblut ist eine Anreicherung mit einer Schwankungsbreite von 5o - 9o % der im Normalblut enthaltenen Gesamtleukozyten zu erzielen. Die Ausbeute dürfte sich bei routinemässiger Anwendung verbessern. Die absoluten Anreicherungswerte liegen bei 1oo - 2oo x $1o^6$/ml aus 2o - 5o ml Blut und befinden sich somit in der für die passive Übertragung der Kontaktdermatitis erforderlichen Grössenordnung (9).

Regelmässig angefertigte Kontrollausstriche (Färbung MAY-GRÜNWALD) zeigen morphologisch intakte Lymphozyten, während die Zellstruktur der granulierten Leukozyten Schäden aufweist. Die Vitalität der angereicherten Zellen wurde nicht weiter untersucht.

Erwähnt werden sollte die bei dieser Methode auftretende Erythrozytenverunreinigung. Aus diesem Grund ist die mit verschiedenen Variationen für Humanblut angegebene Sedimentationsmethode, s. LAWRENCE (17, 18), BAER et al. (3, 4), BRAUNSTEINER et al (5) sowie die hier angegebenen Modifikationen für Untersuchungen, bei denen Erythrozyten stören können, als nicht ausreichend anzusehen.

Eine Übertragung der für Humanblut ergiebigen Sedimentationsmethode auf das Meerschweinchenblut gelang in den eigenen Versuchen im Gegensatz zu DE WECK und BRUN (26) nicht.

Zu B,IV und V)

Die Ergebnisse der Leukozytenanreicherung durch Zentrifugieren des Humanblutes mit hochprozentiger Glykogenlösung stehen mit durchschnittlich 6o% der im verarbeiteten Blut enthaltenen Leuko-

zyten um 1o% hinter den Ergebnissen der Sedimentationsmethode zurück. Ein wesentlicher Vorteil der Glykogen-Zentrifugiermethode dagegen dürfte die vollständige Erythrozytenfreiheit des buffy coat für entsprechende Versuchsanordnungen sein. Vergleicht man weiterhin die Arbeitszeiten für die Sedimentations- bzw. Zentrifugiermethode mit Glykogenlösung, so ist die für letztere benötigte erheblich kürzer. Wie bei der Sedimentationsmethode ergeben routinemässigvom Buffy coat angefertigte Kontrollausstriche (Färbung MAY-GRÜNWALD) morphologisch intakte Lymphozyten, während die granulierten Leukozyten geschädigt erscheinen.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht in ihrer Übertragbarkeit auf das Meerschweinchenblut. Es liessen sich Anreicherungsergebnisse von 4o - 8o % der im verarbeiteten Ms-Blut enthaltenen Leukozyten erzielen. Der Lymphozytenanteil betrug durchschnittlich 5o%. Um diesen eventuell zu erhöhen, wurde eine Differenzierung des gewonnenen buffy coat mit Hilfe von Glykogenlösungen verschiedenen spezifischen Gewichtes versucht. Zuvor wurde das spezifische Gewicht der Meerschweinchenblutzellen mittels Ester-Lösungen bestimmt.

Als Ergebnis zeigte sich im Überstand lediglich bei 3 von 24 Humanblut-Zentrifugaten eine Lymphozytenkonzentration von 8o - 1oo %, desgleichen in 13 von 6o Zentrifugaten bei Meerschweinchen-buffy-coat bei hohem Lymphozytenanteil auch des Bodensatzes. Eine Fehlerquelle ist möglicherweise in der Veränderung des spezifischen Gewichtes der als Trennlösung gedachten Glykogenlösungen durch Hinzufügen der buffy-coat-Aufschwemmung zu suchen.

Erschwerend für die Differenzierung des buffy coat wirkte sich ferner die Zusammenballung der buffy-coat-Zellen aus, die auch durch schonende Aufschwemmung (Ringer-Laktat, Glasperlen) nicht zu beseitigen war. Ob das Zentrifugieren (maximal ca 2ooo g) oder die Verwendung einer 22,5%igen Glykogenlösung einen ursächlichen Faktor für die Zusammenballung der buffy-coat-Zellen darstellten, wurde nicht weiter untersucht.

Abschließend sei zur Glykogen-Methode bemerkt, daß eine Rückgewinnung des ziemlich kostspieligen Glykogens durch Kochen mit starken Laugen (15, 16) möglich ist.

D) Zusammenfassung

Einleitend (A) werden Daten aus der Physiologie des Human- und Meerschweinchenblutes sowie bekannte Methoden zur Leukozytenanreicherung erwähnt.

Abschnitt B enthält eigene Untersuchungen und Ergebnisse. Mit Hilfe der bekannten Sedimentationsmethode (3, 4, 5, 17, 20) (I) wurden in eigenen Untersuchungen mit Humanblut Leukozytenanreicherungen von 100 - 200 x 10^6/ml erzielt, im Durchschnitt 70% der im verarbeiteten Blut enthaltenen Leukozyten. Während in den Kontrollausstrichen (Färbung MAY-GRÜNWALD) die Lymphozyten morphologisch unversehrt erscheinen, weisen die Granulozyten strukturelle Schäden auf. Bei Verwendung von Meerschweinchenblut konnte eine Leukozytenanreicherung nicht erzielt werden.

Zentrifugation von Roh-buffy-coat mit 1%iger Na-Desoxycholat-30%iger-Saccharose-Lösung (II) sowie mit hochprozentiger Eiweißlösung (III) ergab keine befriedigenden Ergebnisse hinsichtlich Reinigung der Leukozyten von störenden Erythrozyten.

Hingegen gelang eine weitgehende Leukozytenisolierung durch Zentrifugieren mit 22,5%iger Glykogen-Lösung sowohl mit Human- als auch mit Meerschweinchen-Blut (Reingewinnung von durchschnittlich 50% der im verarbeiteten Blut enthaltenen Leukozyten mit einer Lymphozytenquote von 80% bzw. ca. 60% mit 50% Lymphozyten). In Kontrollausstrichen erschienen die Lymphozyten morphologisch intakt, während die Granulozyten eine Schädigung der Zellstruktur erkennen ließen.

Als wesentlicher Vorteil dieser Methode dürfte die Erythrozytenfreiheit des gewonnenen buffy coat anzusehen sein.

Der Versuch einer Differenzierung der im buffy coat enthaltenen Leukozyten mit Hilfe von Glykogenlösungen verschiedenen spezifischen Gewichtes nach vorausgehender Bestimmung des spezifischen Gewichtes der Meerschweinchen-Blutzellen mittels Esterlösungen führte zu keinem befriedigenden Ergebnis.

BIBLIOGRAPHIE

1. Autoren, die in Abschnitt A,I und II mit (+) bezeichnet werden, sind zitiert nach

   a) HINSBERG, K.: Das Blut als Ganzes, in B. FLASCHENTRÄGER und E. LEHNARTZ: Physiologische Chemie, Der Stoffwechsel 1. Teil, Springer Verlag 1954

   b) SCHEMMER, S.: Pathologie der Laboratoriumstiere, herausgegeben von P. COHRS, R. JAFFEE, H. MEESSEN

2. AGRANOFF, B.W., BERT L. VALLEE und DAVID F. WAUGH: Centrifugal Subfraction of Polymorphonuclear Leukozytes, Lymphozytes and Erythrozytes. Blood 9/804 (1951)

3. BAER, RUDOLF L. und M. B. SULZBERGER: Attempts at passive transfer of allergic exzematous sensitivity in man. J. Invest. Dermat. 18/53 (1952)

4. BAER, RUDOLF L., SERRI, F. und KIRMAN, D.: Attempts at passive transfer of allergic exzematous sensitivity in man by means of white cell suspensions. J. Invest. Dermat. 19/217 (1952)

5. BRAUNSTEINER, H., F. PAKESCH und H. VETTER: Isolierung und Anreicherung funktionstüchtiger Leukozyten und Thrombozyten mittels Polyvinylpyrrolidon. Acta Haematologica 8/304 (1952)

6. CHASE, M.W.: Development of antibody following transfer of cells taken from lymphnodes of sensitized or immunized animals. Fed. Proc. 10/404 (1951)

7. CURTIS, G.H.: An attempt to demonstrate antibodies in eczematous contacttype dermatitis. Arch. Dermat. & Syph. 65/149 (1952)

8. EDSALL, JOHN T.: The plasma proteins and their fractionation. Ergebnisse der Physiologie und Exper. Pharmakologie, Springer, 1950

9. EPSTEIN, W.L. und A. M. KLIGMAN: Transfer of allergic contact-type delayed sensitivity in man. J. Invest. Dermat. 28/291 (1957)

10. FREEDMAN, SAMUEL, O. and ALFRED J. FISH: The passive cellular transfer of delayed type hypersensitivity to intradermal Procaine. J. Invest. Dermat. 38/363 (1962)

11. HARBER, L.C. und RUDOLF L.BAER: Attempts to transfer eczematous contact-type allergy with whole blood transfusions.
J.Invest.Dermat. 36/55 (1961)

12. HAXTHAUSEN, H.: Studies on the role of lymphzytes as "transmitter" of the hypersensitiveness in allergic eczema.
Acta dermat.-venereol. (Stockholm) 27/275 (1947)

13. HAXTHAUSEN, H.: Experiments on passive transfer of eczematous allergy in man.
J.Invest.Dermat. 19/293 (1952)

14. HAXTHAUSEN, H.: Attempts on passive local sensitization by i.c. injection of cells from freshly excised lymphnodes of eczema allergics.
J.Invest.Dermat. 21/273 (1953)

15. HINSBERG, K. und K.LANG: Medizinische Chemie für den klinischen und theoretischen Gebrauch.
3.Auflage, Urban und Schwarzenberg 1957

16. HEYNS, K.: Polysaccharide in HOPPE-SEYLER/THIERFELDER: Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse, 10. Auflage, Springer 1955

17. LAWRENCE, H.S.: The cellular transfer in humans of delayed cutaneous reactivity to haemolytic streptococci.
J. Immunol., 68/159 (1952)

18. LAWRENCE, H.S.: The transfer of hypersensitivity of the delayed type in man; cellular humoral aspects of the hypersentitive state.
New York Academy of Medicine, 7/279, P.C.Hoeber Inc. 1959

19. MENIGHINI, C.L. and LEVI, L.: Allergie eczemateuse: Essais de transfort passif.
Acta Allergologica XIII/432 (1959)

20. MINOR, A.H. and BURNETT, L.: Method for isolating living polymorphonuclear leucocytes from peripheral blood.
BLOOD 4/667 (1949)

21. RAUEN, H.M.: Biochemisches Taschenbuch 1.Auflage Springer 1956

22. SCHEPANK, H.: Über das normale Blutbild und die Körpertemperatur des Meerschweinchens.
Z.schr.Haut-u.Geschl.Krkh. 16, 282 (1954)

23. SERRI, F.: Sulla possibilita da transportor passivo della sensibilita exzematosa allergica del typo da contatto nell'uomo a mezzo di transfusioni di sangue totale.
Minerva Dermat.(Torino) 34/542 (1959)

24. SKOG, E.: Experimental studies on hypersensitivity to 2,4-DNCB and tuberculin in animals. I.: Passive transfer of hypersensitivity to DNCB.
Acta dermat.-venereol. (Stockholm) 35/93 (1955)

25. SKOG, E.: Experimental studies on hypersensitivity to 2,4-DNCB and tuberculin in animals. V.: Passive transfer experiments with lysed cells.
Acta dermat.-venereol. 36/1 (1956)

26. DE WECK, A. und R. BRUN: De l'eczema experimental.
Acta dermat.-venereol. 36/360 (1956).

Lebenslauf

Am 5. November 1932 wurde ich als Tochter des Ingenieurs Paul Konietzko in Breslau geboren.

Nach Bestehen des Abiturs an der Sophie-Charlotte-Schule, Berlin-Charlottenburg, im März 1952 begann ich an der Freien Universität Berlin das Medizinstudium, in dessen Verlauf ich einige Semester an der Albrecht - Ludwigs-Universität, Freiburg/Br. sowie der Universität Wien verbrachte. 1960 legte ich das Medizinische Staatsexamen an der Freien Universität Berlin ab. Die zwei folgenden Medizinalassistentenjahre absolvierte ich an Berliner Krankenhäusern, um mit dem 30.4.1962 die Approbation zu erhalten.

Von Oktober 1962 bis März 1964 war ich als Assistenzarzt für Anästhesie am St. Raphael's Hospital, New Haven/Conn., USA, tätig. Seit Januar 1965 gehöre ich der Anästhesie-Abteilung des Städtischen Krankenhauses Neukölln an.